

# Método para la extracción de ADN cloroplastídico de *Bouteloua gracilis* como herramienta para aplicaciones moleculares

## Method of chloroplast DNA extraction from *Bouteloua gracilis* as a tool for molecular applications

DAVID I. HERNÁNDEZ-QUEZADA<sup>1</sup>, SIGIFREDO ARÉVALO-GALLEGOS<sup>1</sup>, DAVID A. BETANCOURT-GUERRA<sup>1</sup>,  
ARMANDO AGUADO-SANTACRUZ<sup>2</sup>, TANIA SIQUEIROS-CENDÓN<sup>4</sup>, BLANCA RIVERA-CHAVIRA<sup>1</sup>,  
GUADALUPE VIRGINIA NEVÁREZ-MOORILLON<sup>1</sup> Y QUINTÍN RASCÓN-CRUZ<sup>1,3</sup>

Recibido: Mayo 10, 2011

Aceptado: Octubre 24, 2011

### Resumen

La manipulación genética del genoma de cloroplasto esta a la vanguardia en investigación biotecnológica. El pasto *B. gracilis* es un modelo para el estudio de estrés hídrico y oxidativo, capacidades relacionadas al cloroplasto. Es necesario tener un método que facilite la obtención de ADN de buena calidad, particularmente cuando se refiere al ADN de cloroplasto de *B. gracilis*. La implementación de un método para la extracción de cpADN se logró probando diferentes estrategias de extracción de cpADN reportados en la literatura y combinando las etapas más apropiadas para *B. gracilis*. La incorporación de un paso adicional del lavado con CTAB permitió la recuperación de cpDNA enriquecido, el cual se puede utilizar en el desarrollo de hermanitas moleculares. Debido a la implementación de un protocolo de extracción también fue posible obtener una cantidad considerable de cpADN de *B. gracilis*. El cpADN fue digerido con varias enzimas de restricción y los fragmentos resultantes fueron analizados por Southern blot con las sondas de los genes de rADN 16S y 23S. Con base en los perfiles de restricción, en este trabajo se reporta un mapa parcial de restricción del genoma del cloroplasto de *B. gracilis* y se plantea que la metodología aquí establecida en un futuro permitirá abordar la manipulación genética del genoma de cloroplasto.

**Palabras clave:** Análisis molecular, clonación de genes, mapa genético, transferencia horizontal de genes.

### Abstract

Genetic manipulation of the chloroplast genome is at the forefront of biotechnology research. *B. gracilis* is a model for the study of water stress and oxidative capacities related to the chloroplast. It is requires a method to facilitate the obtaining of good quality DNA, particularly when it comes to chloroplast DNA of *B. gracilis*. The implementation of a method for extracting cpDNA was achieved by assaying different strategies cpDNA extraction reported in the literature and combining the most appropriate stage for *B. gracilis* for cpDNA extraction. The incorporation of an additional step of washing with CTAB after lysis of chloroplasts, allowed the recovery of enriched cpDNA which can be used in the development of molecular tools. Due to the implementation of an extraction protocol was also possible to obtain a considerable amount of *B. gracilis* cpDNA. The cpDNA was digested with several restriction enzymes and the resulting fragments were analyzed by Southern blot with probes of genes 16S and 23S rDNA. The method developed allowed us to obtain a considerable amount of cpDNA of *B. gracilis* which can be cut with restriction enzymes and used for genetic mapping. These results allow us in future work for the genetic manipulation of the chloroplast genome.

**Keywords:** Molecular analysis, gene cloning, gene mapping, horizontal gene transfer

### Introducción

Las células de las plantas verdes y algunos protistas contienen organelos llamados cloroplastos; estos organelos pueden convertir la luz en energía química utilizable por el organismo (Blaustein *et al.*, 1998). Los cloroplastos son organelos intracelulares que contienen la maquinaria necesaria para los procesos involucrados en la fotosíntesis. Estos participan en la biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos (Sugiura, 1992).

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. Campus Universitario II. Apdo. Postal 1542-C. Chihuahua, Chih., México. 31125. Tel. (614) 236-6000.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Carretera Celaya-San Miguel de Allende S/N CP.30110. Celaya, Gto. México.

<sup>3</sup> Dirección electrónica del autor de correspondencia: qrascon@uach.mx.

Al igual que las mitocondrias, el estroma de un cloroplasto alberga pequeñas moléculas de ADN circular de doble cadena y ribosomas similares a las procariotas. El estudio de esta molécula promete ser una alternativa para el desarrollo biotecnológico de gramíneas de importancia en campos como la ganadería y la agricultura, además de ser una herramienta útil en el estudio de las características fisiológicas relacionadas con el cloroplasto. En 1963 se comprobó que los cloroplastos contenían su propio ADN (Sager e Ishida, 1963); el ADN del cloroplasto (cpADN) es un remanente de genomas de un simbiote bacteriano ancestral. Dependiendo del organismo, el cloroplasto contiene de 60 a 200 genes que participan en la expresión génica (Leister, 2003). El tamaño de la molécula de ADN cloroplastídico puede variar, dependiendo de la especie, entre 120 y 170 Kb (Palmer, 1987). En los años 80 surgió la idea de realizar ingeniería genética dentro del cloroplasto (Daniell *et al.*, 2002), desde entonces, el estudio del cpADN de diferentes especies se ha perfilado como uno de los objetivos de la manipulación genética (Bogorad, 2000). Ya se ha logrado insertar genes heterólogos en el genoma de cloroplasto; se han expresado antígenos para la elaboración de vacunas dentro de este organelo (Chebolu y Daniell, 2007; Tregoning *et al.*, 2003), así como proteínas de interés farmacéutico como el IGF-1 (Ruiz, 2002). La modificación genética dentro del cloroplasto tiene ventajas cuando se compara con la modificación de ADN nuclear, debido a que las condiciones internas del cloroplasto presentan menos mecanismos de regulación debido a su carácter procariótico (Koya y Daniell, 2005). Además, la característica de mayor interés del cloroplasto es la manera como se transfiere a su descendencia preferentemente vía materna, lo que hace a este organelo un contenedor de genes con capacidad para evitar la liberación de polen transgénico (Scotty Wilkinson, 1999), es decir, evitar la transferencia horizontal de genes.

La línea de investigación está enfocada al estudio del cpADN de *B. gracilis* (navajita azul), el cual es un pasto forrajero presente en amplias regiones del continente (García-Sánchez y Monroy-Ata, 2005) y posee importantes características relacionadas a la resistencia al estrés hídrico. El interés del grupo de investigación es desarrollar metodologías moleculares para el análisis de la organización de los genes cloroplastídicos debido a dos características importantes de este organelo y su ADN: uno, participa bioquímica y molecularmente en el desarrollo y adaptación de la planta al medio ambiente y dos, los caracteres codificados en el genoma cloroplastídico sólo se segregan vía materna.

El primer paso para realizar investigación relacionada con ADN de cloroplasto fue elaborar una estrategia que permitiera obtener fracciones enriquecidas de cpADN de buena calidad y en cantidad suficiente para llevar a cabo los experimentos necesarios dentro del laboratorio. Se han desarrollado varios métodos para la extracción de cpADN, la mayoría de los métodos contienen tres etapas principales: 1) La separación de los cloroplastos de otros organelos, 2) La lisis de los cloroplastos y 3) La purificación del cpADN (Jansen *et al.*, 2005). Algunos métodos utilizan gradientes de sacarosa (Palmer, 1987), soluciones con altas concentración de NaCl (Bookjans *et al.*, 1984) y tratamiento con DNAsa 1 (Kolodner y Tewari, 1979). Nuestro grupo de investigación, utilizando un método salino sin DNAsa, logró extraer suficiente ADN para hacer análisis molecular; sin embargo, es un método que no resultó eficiente y simple para la recuperación de ADN de cloroplasto enriquecido (Aguado *et al.*, 2011). Se ha reportado que la extracción de cpADN en plantas pertenecientes a la familia *Poaceae* es difícil de realizar debido a las características fisiológicas de las plantas por su alto contenido de lignina y polisacáridos (Diekmann *et al.*, 2008), y en algunos casos ha sido necesaria la adición de etapas de purificación del ADN durante la extracción del cpADN (Virupakshi y Naik, 2007).

En el presente trabajo se desarrolló un método de extracción donde, el primer objetivo fue mejorar el rendimiento para la obtención de cpADN; el segundo objetivo fue recuperar cpADN con una pureza tal que fuera posible realizar un patrón de digestión y mapa genético parcial de un segmento del cpADN de *Bouteloua gracilis*, como herramienta molecular.

## Materiales y métodos

*Extracción ADN cloroplastídico de Bouteloua gracilis.* Se colocaron 40 gramos de células clorofilicas (c.c.) con 180 ml de buffer de extracción (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.1% BSA, 0.1%  $\beta$ -mercaptoetanol). La mezcla se licuó por 2 min (en un vaso previamente enfriado), en lapsos de 30 s cada vez. El homogenizado fue filtrado a través de ocho capas de gasa y recuperado en un recipiente estéril y frío. El filtrado fue centrifugado a 1,000 rpm por 20 min a 4°C, trasladando el sobrenadante a un recipiente limpio y descartando la pastilla, la cual contenía restos celulares y células no lisadas. El sobrenadante fue centrifugado a 4,500 rpm por 20 min a 4°C con el fin de empaquetar los cloroplastos (pastilla enriquecida con cloroplastos), dejando en la suspensión las mitocondrias. Con cuidado, la pastilla se resuspendió con 5 ml de buffer de lavado frío (0.35 M Sorbitol, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA) para no lisar los cloroplastos. Después, se agregaron 50 ml de buffer de lavado y se centrifugó a 4,500 rpm por 20 min a 4 °C. La pastilla se resuspendió con una pipeta de boca ancha en 1 ml de amortiguador de resuspensión frío (100 mM Tris-HCl, pH 7.2, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.2%  $\beta$ -mercaptoetanol) y se transfirió a tubos de 1.5 ml, repartiendo en volúmenes iguales (650 ml). A los tubos se les agregó 60 ml de SDS al 10%, y se mezcló; los tubos se calentaron a 60 °C en baño María por 5 min. Después de la lisis, a los tubos se les agregó 3 ml de RNasa (10 mg/ml), 5 ml de proteinasa K (10 mg/ml) y 30 ml de SDS al 10%, esta solución se incubó durante 25 min a 37°C; se agregaron 100 ml de 5 M NaCl y 80 ml de solución CTAB/

NaCl (10% CTAB, 0.7 M NaCl); se incubó durante 15 min a 65°C, posteriormente se agregó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó durante 5 min, los tubos se centrifugaron por 10 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente, se descartó la fase fenólica y la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio. A la fase acuosa se le agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó durante 5 min, el tubo se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa, se transfirió a un tubo limpio y se agregó 1/10 de volumen de acetato de amonio 5 M y 1 volumen de isopropanol, La mezcla se incubó toda la noche a -20 °C. Al siguiente día, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C; se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregó un volumen de etanol al 7%; se centrifugó en las condiciones anteriores. Se decantó el etanol y a la pastilla resultante se le agregó un volumen de etanol absoluto y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min a 4°C. Se descartó el etanol, la pastilla se secó a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 10 ml de agua destilada estéril. Para la cuantificación del ADN, se realizó una dilución 1:100 con agua destilada estéril. La dilución se analizó a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (SmartSpec 3000, BioRad).

*Marcaje de sondas de las sondas 16S y 23S ribosomales con digoxigenina.* Las sondas se marcaron mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa incorporando dUTP-digoxigenina en los fragmentos de los genes de interés (Hoisington *et al.*, 1994) e iniciadores específicos para cada sonda. La reacción (volumen final 50 ml) contuvo 1X Taq Buffer, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP's, 2.4 nM dTTP-Dig, 2  $\mu$ M Forward y Reverse Oligonucleótido, 2 U de Taq polimerasa y 10 ng de ADN). Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C/ 3 min desnaturalización inicial, 95 °C/30 s desnaturalización, 60 °C/40 s alineamiento, 72 °C /40 s extensión, durante 35 ciclos y una xtensión final de 10 min a 72 °C.

*Detección de genes por hibridación tipo Southern blot.* Las muestras de cpADN sometidas a digestión con enzimas de restricción, fueron separadas electroforéticamente en geles de agarosa y antes de la transferencia el gel fue depurinado con 100 mM HC por 30 min y luego desnaturalizado con 1.5 M NaCl y 200 mM NaOH durante 30 min. La transferencia del ADN a membranas de nylon se realizó de acuerdo con lo reportado por Southern (1975). Se realizó una pre-hibridación e hibridación en tubos de vidrio dentro de un horno a 65 °C con solución HYB (5 X SSC, 0.1% Laurilsarcosina, 0.2% SDS, 1% Reactivo de bloqueo) suplementado con 1 ng/ml de sonda marcada con digoxigenina específica para cada gen, siguiendo las instrucciones descritas por Hoisinton *et al.* (1994). La detección inmunológica y el revelado quimioluminiscente (CSPD-Star) se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Kessler *et al.* (1990).

## Resultados y discusión

*Implementación de la extracción de cpDNA.* El método desarrollado consiste en varias etapas de fácil realización, como la molienda, eliminación de contaminantes de elevado peso molecular y la separación de los cloroplastos mediante centrifugación; también contiene soluciones diseñadas para la disolución de ADN nuclear contaminante (Bookjans *et al.*, 1984; Triobush *et al.*, 1998; Virupakshi y Naik, 2007). Contiene una etapa de purificación de ácidos nucleicos haciendo uso de la estructura molecular y de las características fisicoquímicas del detergente Bromuro Cetiltrimetilamonio (CTAB). En este método, el punto clave para la obtención de cpADN puro e íntegro es la extracción con el detergente CTAB, esto se debe a que este detergente se adhiere a estructuras con características fisicoquímicas similares a los sacáridos, polisacáridos y polifenoles; en bajas concentraciones iónicas, el detergente se une a la estructura de los sacáridos de los ácidos nucleicos; al elevar la polaridad del medio en el que se encuentra el CTAB debilita su adhesión

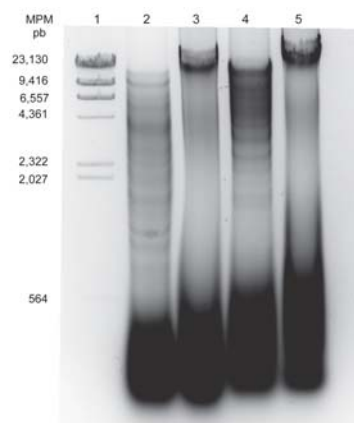
(Virupakshi y Naik, 2007). Este tratamiento permitió obtener una pastilla de cpADN con la calidad suficiente para ser tratada con diferentes enzimas de restricción.

Como material inicial se utilizaron 40 g de células clorofílicas de *B. gracilis* y 25 g de acelga (*Beta vulgaris*) esta última como control de extracción. Se obtuvo un mayor rendimiento en la cantidad de cpADN obtenida en *B. vulgaris* debido a su alto contenido de cloroplastos; el rendimiento para las células clorofílicas (c.c.) de *B. gracilis* aumentó (Cuadro 1), en comparación al rendimiento promedio obtenido en la misma especie al utilizar el método salino (Bookjans *et al.*, 1984). Cuatro mg de cpADN de *B. vulgaris* y de c.c. de *B. gracilis* se digirieron con EcoRI, el producto obtenido fue separado mediante electroforesis en un gel de agarosa (Figura 1); con la finalidad de observar la integridad del cpADN.

**Cuadro 1.** Concentraciones de cpDNA obtenidas a partir de células clorofílicas de *B. gracilis* y *B. vulgaris* con el método salino modificado con CTAB.

| Material inicial           | Concentración (ng/μl) | Abs 260/280 nm | Total (μg) | Rendimiento (μg/g) |
|----------------------------|-----------------------|----------------|------------|--------------------|
| C.c. de <i>B. gracilis</i> | 2.6                   | 1.89           | 104        | 2.6                |
| <i>B. vulgaris</i>         | 2.8                   | 1.85           | 140        | 5.6                |

**Figura 1.** Separación electroforética de la digestión de cpDNA de c.c. de *B. gracilis* y *B. vulgaris*. Carril 1, marcador I-HindIII; carril 2 cpDNA de *B. vulgaris* con EcoRI; carril 3, cpDNA *B. vulgaris* sin cortar; carril 4 cpDNA de c.c. de *B. gracilis* con EcoRI; carril 5, cpDNA de c.c. de *B. gracilis* sin cortar.



En la Figura 1 se observó un patrón de digestión para ambas especies en los carriles 2 y 4 (*B. gracilis* y *B. vulgaris*). Es posible observar en los carriles 3 y 5 una banda de ADN de alto peso molecular que corresponde al cpADN no cortado. En la parte inferior de los carriles se observó una cantidad considerable de ARN. Los resultados de la pureza y digestión del ADN son similares a lo reportado por Bookjans *et al.* (1984) y por Triobush (1998).

La adición de RNAsa antes de la lisis cloroplastídica elimina la presencia de ARN, por lo que la cuantificación se atribuye a la presencia de cpADN. En el análisis espectrofotométrico se observó una relación en la absorbancia 260/280 cercana al 2.0, esto indica que la pureza del cpADN es buena (Cuadro 2) y que la absorbancia es debida preferentemente a la presencia de cpADN y no a ARN (Figura 2). Si bien el rendimiento en mg/g fue inferior, se mantuvo la cantidad de cpADN recuperado (Cuadro 2).

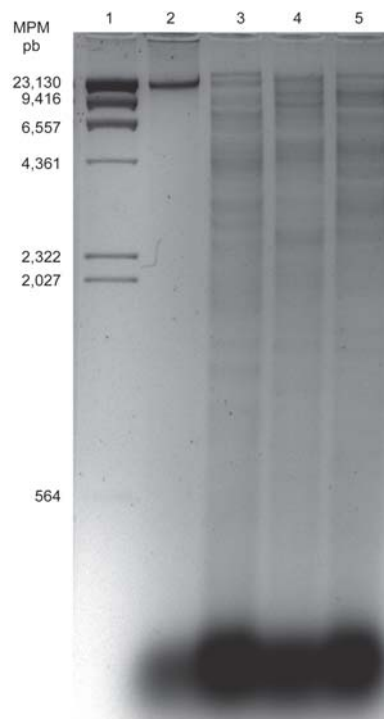
**Cuadro 2.** Concentraciones de cpDNA obtenidas a partir de c.c. de *B. gracilis* con el método salino modificado con CTAB mas RNAsa.

| Material inicial             | Concentración (ng/μl) | Abs 260/280 nm | Total (μg) | Rendimiento (μg/g) |
|------------------------------|-----------------------|----------------|------------|--------------------|
| C.c. de <i>B. gracilis</i> 1 | 3.345                 | 1.98           | 133        | 3.325              |
| C.c. de <i>B. gracilis</i> 2 | 3.590                 | 1.99           | 144        | 3.6                |

El cpADN obtenido a partir de *B. gracilis* fue cortado con diferentes enzimas de restricción. En la Figura 2 es posible observar que se presentó un patrón de digestión claro para las tres enzimas utilizadas (EcoRI, BamHI, HindIII).

En la Figura 2 se observó también menor cantidad de RNA comparado con la Figura 1 debido al uso de RNAsa. Se observó que con este método la banda de cpADN de *B. vulgaris* y de c.c. de *B. gracilis* (Figura 1) fue semejante en intensidad e integridad, por lo que se puede inferir que el tratamiento con el detergente CTAB no afectó la integridad de ADN y permitió obtener cantidades similares de ADN, en detrimento del rendimiento.

**Figura 2.** Separación electroforética de la digestión cpDNA de c.c. de *B. gracilis*. Carril 1, MPMI-HindIII; carril 2, cpDNA c.c. de *B. gracilis* sin digerir; carril 3, cpDNA c.c. de *B. gracilis* con EcoRI; carril 4, cpDNA c.c. de *B. gracilis* con HindIII; carril 5, cpDNA c.c. de *B. gracilis* con BamHI.



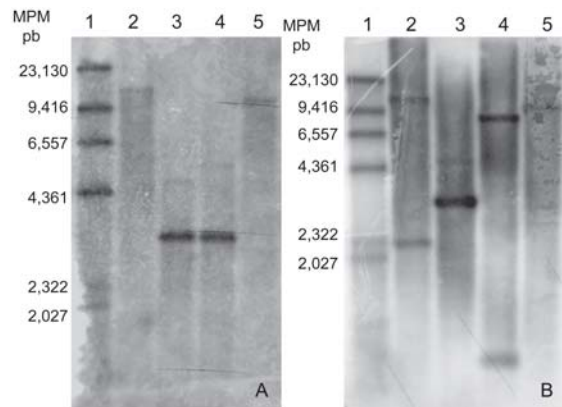
Se puede observar que el tratamiento con CTAB después de la lisis cloroplastídica permite separar al cpADN de contaminantes que en ocasiones inhiben la acción de las enzimas de restricción. El CTAB permite separar a las ribosomas de los ácidos nucleicos contaminantes, ya que estos tienen una estructura similar, que se adhieren a estos azúcares, como lo son los polisacáridos y polifenoles (Virupakshi y Nail, 2007). Existen por tanto compuestos contaminantes de características fisicoquímicas similares a las del ADN que son extraídas de manera simultánea.

Para mostrar el potencial uso de este método como herramienta para el análisis molecular, se realizó un mapa parcial de segmentos ribosomales del cpADN.

Mapa de los genes de rADN 16S y 23S en el genoma cloroplástico de *B. gracilis*. Para la identificación del gen de rADN16S y 23S en el cpADN de *B. gracilis*, el cpADN se sometió a restricción con diferentes enzimas; los productos digeridos fueron separados electroforéticamente y transferidos a membranas de nylon; posteriormente mediante Southern blot con las ondas ribosomales 16S y 23S los genes arriba referidos fueron identificados en la membrana conteniendo el DNA digerido. En la Figura 3 A, se observa la hibridación de la sonda 16S ribosomal con fragmentos de 16000, 3300, 3300 y 12300 resultantes de la restricción con las enzimas EcoRI, EcoRI/BamHI, BamHI y HpaI, respectivamente. El gen ribosomal 23S mostró un perfil de hibridación distintivo, con fragmentos tanto de alto peso molecular como de bajo peso molecular (Figura 3B).

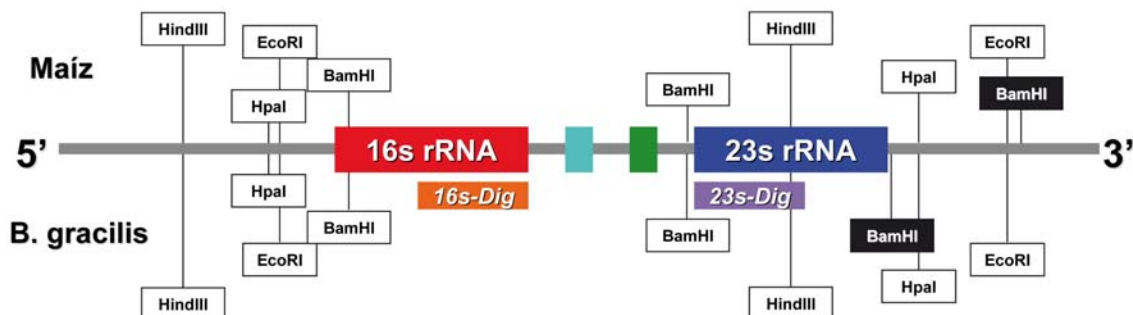
La hibridación con el 23S ribosomal (Figura 3B) muestra fragmentos de 15058, 3452, (8841, 890) y 11547 pb con las enzimas EcoRI, BamHI, HindIII y HpaI, respectivamente. En los carriles 5 de la Figura 3 A y B se corrió ADN de cpDNA de maíz como referencia debido a que el maíz y el zacate *B. gracilis* pertenecen a la misma familia. La combinación de estos datos de hibridación permitió elaborar un mapa parcial de restricción (Figura 4).

**Figura 3.** Hibridación tipo Southern blot del cpDNA de *B. gracilis* cortado con diferentes enzimas. **A.** Hibridación con sonda 16S. Carril 1, MPM λ HindIII-Dig; carril 2, cpDNA *B. gracilis* con EcoRI; carril 3, cpDNA *B. gracilis* con EcoRI y BamHI; carril 4, cpDNA *B. gracilis* con BamHI; carril 5, cpDNA *Z. mays* con HpaI. **B.** Hibridación con sonda 23S. Carril 1, MPM λ HindIII-Dig; carril 2, *B. gracilis* con EcoRI; carril 3, *B. gracilis* con BamHI; carril 4, *B. gracilis* con HindIII; carril 5, *Z. mays* con HpaI.



Debido a la conservación de los genomas de los cloroplastos en plantas, se consideró que el genoma de maíz puede servir como referencia. Esto se confirmó utilizando la base de datos de GeneBank y los genomas reputados de cpDNA de maíz (accesión AY928077) y *B. gracilis* (accesión EU282003) analizados utilizando la herramienta de Clustal X 2.0 (resultados no mostrados). La similitud entre los resultados esperados permitió asumir que los sitios de corte en *B. gracilis* se encuentran posicionados justo donde se espera que estén localizados los sitios en maíz, con excepción del sitio de corte para la enzima BamHI que está ubicado en diferente posición, quizá sea la única diferencia entre estos dos segmentos (Figura 4).

**Figura 4.** Mapa parcial de restricción de un repetido invertido del cpDNA de *Bouteloua gracilis* y *Zea mays*. El mapa comprende la secuencia presente entre los nucleótidos 90741 y 105618 del cpDNA de maíz, la diferencia encontrada en el sitio de restricción para la enzima BamHI se muestra en un recuadro negro.




## Conclusiones

En el método desarrollado se implementaron etapas de separación de los organelos basados en los métodos salinos reportados por Triobush en 1998 y por Bookjans en 1984 utilizando NaCl con la finalidad de eliminar ADN nuclear que pudiera estar adherido a las membranas cloroplastídicas. El paso incorporado es una etapa de purificación del cpADN con el detergente CTAB después de la lisis cloroplastídica, con el fin de eliminar contaminantes que se encuentran adheridos a los esqueletos de fosfato del cpDNA. El uso de RNasa tiene un efecto positivo en la cantidad y calidad de cpDNA extraído en este método. La elaboración de un mapa parcial de restricción permite asumir que el método de extracción se puede utilizar para el desarrollo de herramientas moleculares y para el análisis el genoma cloroplastídico.

## Literatura citada

- AGUADO-SANTACRUZ, G.A., D.A. Betancourt-Guerra, T. Siqueiros-Cendón, S. Arévalo-Gallegos, B. Rivera-Chavira, G.V. Nevárez-Moorillon, B.M. Moreno-Gómez and Q. Rascón-Cruz. 2011. Comparison of the structure and organization of the rna operons of *Bouteloua gracilis* and *Zea mays*. *Can. J. Plant Sci.* 91:107-116.
- BLAUSTEIN, D.R., Johnson, and D. Mathieu. 1998. Biology. The dynamics of life. McGraw-Hill. Cap. 8:204.
- BOGORAD, L. 2000. Engineering chloroplasts; an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol.* 18:257-263.
- BOOKJANS, G., B.M. Stummann, and K. Henningsen. 1984. Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic-strength. *Anal. Biochem.* 141: 244-247.
- CHEBOLU, S. and H. Daniell. 2007. Stable expression of GAL/GALNAclectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplast and immunogenicity in mice towards vaccine development for amebiasis. *Plant Biotech. J.* 2:230-239.
- DANIELL, H., M.S. Khan, and L. Allison. 2002. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* 7:84-91
- DIEKMANN, K., T. Hodkinson, E. Fricke, and S. Barth. 2008. An optimized chloroplast DNA extraction protocol for grasses (*Poaceae*) proves suitable for whole plastid genome sequencing and SNP detection. *PLoS ONE* 3: 7.

- GARCÍA-SÁNCHEZ, R., y A. Monroy-Ata. 2005. Micrositios del pasto navajita (*Bouteloua gracilis*) en comunidades de pastizal y de matorral del altiplano mexicano. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 8: 61-70.
- HOISINGTON, D., M. Khairallah, and D. González-De León. 1994. Laboratory protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. CIMMYT. pp 70.
- JANSEN, R.K., L.A. Raubeson, J.L. Boore, C.W. de Pamphilis, T.W. Chumley, R.C. Haberle, S. K. Wyman, A. J. Alverson, R. Peery, S. J. Herman, H. M. Fourcade, J. V. Kuehl, J. R. McNeal, J. Leebens-Mack, and L. Cui. 2005. Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. *Meth. Enzymol.* 395: 348-384.
- KESSLER, C., H. Hölteke, R. Seibl, J. Buró, and K. Mühlegger. 1990. Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. A novel DNA labeling and detection system based on digoxigenin: Anti-digoxigenin ELISA Principle (digoxigenin system). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 371:917-927.
- KOLODNER, R., and K.K. Tewari. 1979. Inverted repeats in chloroplast DNA from higher plants. *Proc Natl. Acad. Sci.* 76: 41-45.
- KOYA, V., and H. Daniell. 2005. OBPC symposium: maize 2004 & beyond – Recent advances in chloroplast genetic engineering. *In vitro Cell. Develop. Biol. – Plant.* 41:388-404.
- LEISTER, D. 2003. Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet.* 19: 47-56
- PALMER, J.D. 1987. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *Am. Nat.* 130:S6-S29.
- RUIZ, G. 2002. Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of the human IGF-1 in transgenic chloroplasts. M.S. thesis, University of central Florida, Orlando.
- SAGER, R., and M. R. Ishida. 1963. Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Biochemistry* 50: 725-730.
- SCOTT, S.E., and M. J. Wilkinson. 1999. Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. *Nat. Biotechnol.* 17:390-392.
- SOUTHERN, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- SUGIURA, M. 1992. The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* 19: 149- 168.
- TREGONING, J.S., P. Nixon, H. Kuroda, Z. Svab, S. Clare, F. Bowe, N. Fairweather, J. Ytterberg, K. Van Wijk, G. Dougan, and P. Maliga. 2003. Expression of tetanus toxin fragment C in Tobacco chloroplasts. *Nucleic Acid Res.* 31:1174-1179.
- TRIBOUSH, S.O., N.G. Daniilenko, and O.G. Davydenko. 1998. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. *Plant Mol. Biol.* 16: 183-189.
- VIRUPAKSHI, S., and G. Naik. 2007. Purification of DNA from chloroplast and mitochondria of sugarcane. *Curr. Sci.* 92: 1613-1619. 

Este artículo es citado así:

Hernández-Quezada, D. I., S. Arévalo-Gallegos, D. A. Betancourt-Guerra, A. Aguado-Santacruz, T. Siqueiros-Cendón, B. Rivera-Chavira, G. V. Nevárez-Moorillon y Q. Rascón-Cruz. 2011: *Método para la extracción de ADN cloroplastídico de *Bouteloua gracilis* como herramienta para aplicaciones moleculares*. *TECNOCIENCIA Chihuahua* 5(3): 121-128.

## Resúmenes curriculares de autor y coautores

